

SUJET DE LA THÈSE :

LA THRÉONINE DÉSAMINASE DE BACILLUS SUBTILIS:
ETUDES BIOCHIMIQUES ET GÉNÉTIQUES

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie la thèse de Doctorat ès Sciences
naturelles enregistrée au C.N.R.S. sous le Numéro
A. O. 5808.

JUDITH LEIBOVICI

Soutenue le 24 Mai 1971, à la Faculté des Sciences de
l'Université de Paris
devant le jury :

Mme M. GANS

MM. C. ANAGNOSTOPOULOS

R. DEDONDER

Mme H. de ROBICHON-SZULMAJSTER

SUJET DE LA THÈSE :

LA THRÉONINE DÉSAMINASE DE BACILLUS SUBTILIS:
ETUDES BIOCHIMIQUES ET GÉNÉTIQUES

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie la thèse de Doctorat ès Sciences
naturelles enregistrée au C.N.R.S. sous le Numéro
A. O. 5808.

JUDITH LEIBOVICI

Soutenue le 24 Mai 1971, à la Faculté des Sciences de
l'Université de Paris
devant le jury :

Mme M. GANS

MM. C. ANAGNOSTOPOULOS

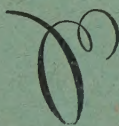
R. DEDONDER

Mme H. de ROBICHON-SZULMAJSTER



J. LEIBOVICI et C. ANAGNOSTOPOULOS

Propriétés de la thréonine désaminase
de la souche sauvage et d'un mutant sensible
à la valine de « *Bacillus subtilis* »



IMPRIMERIE MAURICE DECLUME
LONS-LE-SAUNIER

1969

PROPRIÉTÉS DE LA THRÉONINE DÉSAMINASE
DE LA SOUCHE SAUVAGE
ET D'UN MUTANT SENSIBLE A LA VALINE DE *BACILLUS SUBTILIS*.

par J. LEIBOVICI et C. ANAGNOSTOPOULOS.

Centre de Génétique Moléculaire du C.N.R.S. 91 - Gif-sur-Yvette.

(Mémoire reçu le 28 février 1969).

Résumé. — Les propriétés de la thréonine désaminase de biosynthèse (TD-ase) de *Bacillus subtilis* ont été étudiées avec des extraits acellulaires frais de la souche sauvage et d'un mutant dont la croissance est inhibée par la L-valine. La souche sensible à la valine porte une mutation sur le gène de structure de la TD-ase et ses extraits possèdent une activité spécifique diminuée de cet enzyme.

La TD-ase de la souche sauvage a un K_m apparent de 5×10^{-3} M à pH 8,0. Elle est inhibée par la L-isoleucine (K_i apparent 7×10^{-5} M dans les conditions expérimentales adoptées) et par la L-valine. La valine n'exerce toutefois son action inhibitrice qu'à des concentrations élevées (K_i apparent $= 10^{-2}$ M). Des effets coopératifs du substrat et de l'isoleucine ont été mis en évidence chez cet enzyme. La valine n'active pas cette TD-ase mais, à des faibles concentrations, diminue l'action inhibitrice de l'isoleucine. Les deux inhibiteurs abaissent l'affinité de l'enzyme pour le substrat et semblent avoir aussi un certain effet sur les valeurs de V_{max} observées. Le pH optimum de l'enzyme est environ 9,0. L'action inhibitrice de l'isoleucine et de la valine présente, par contre, un optimum à pH 8,0.

La TD-ase du mutant sensible à la valine présente quelques propriétés différentes de celle de la souche sauvage. Son K_m est plus élevé (2×10^{-3} M à pH 8,0) et on n'observe pas d'effet coopératif du substrat. L'affinité de l'enzyme pour les inhibiteurs (et en particulier pour la L-valine) est, d'autre part, plus élevée (K_i apparents : isoleucine 10^{-5} M ; valine 3×10^{-4} M). Il n'y a pas d'effet coopératif de l'isoleucine. Comme dans le cas de l'enzyme du type sauvage, les inhibiteurs diminuent l'affinité de l'enzyme du mutant pour le substrat.

Les faits observés confirment les observations antérieures suggérant que la TD-ase de *B. subtilis* est bien un enzyme allostérique rétro-inhibé par l'isoleucine. Il s'apparente aux systèmes K du modèle Monod, WYMAN et CHANGEUX. La L-valine semble aussi être un inhibiteur allostérique de l'enzyme. Les résultats suggèrent que la TD-ase du mutant sensible à la valine pourrait être différente de celle du type sauvage dans sa conformation. On pourrait envisager chez l'enzyme du mutant soit la stabilisation d'un état particulier de la molécule, soit une modification de la structure du site catalytique.

Les observations de UMBARGER [1-3] sur l'inhibition de la thréonine désaminase d'*Escherichia coli* par l'isoleucine sont à l'origine de la découverte de la régulation par rétroinhibition des voies de biosynthèse

chez les bactéries. Les études cinétiques détaillées de CHANGEUX [4-13] sur cet enzyme ont par la suite contribué considérablement au développement de la notion de l'allostérie [14, 15]. L'intérêt que présente la thréonine désaminase du point de vue de l'étude de la régulation de l'activité enzymatique a provoqué récemment toute une série de travaux sur les propriétés de l'enzyme produit par différents microorganismes : *Salmonella typhimurium* [16-19], *Saccharomyces cerevisiae* [20-22], plusieurs bactéries photosynthétiques [23-25], *Bacillus licheniformis* [26]. Les thréonine désaminases de ces organismes présentent des caractères communs, mais aussi des différences notables dans leurs propriétés régulatrices.

La thréonine désaminase de *Bacillus subtilis* a été peu étudiée jusqu'à présent. HAYASHIBE et UEMURA [27] ont mis en évidence l'inhibition de son activité par la L-isoleucine. Sa purification est d'autre part actuellement poursuivie par HATFIELD et UMBARGER [28].

Les chaînes de biosynthèse de l'isoleucine et de la valine, ainsi que les relations de liaison des loci génétiques qui les gouvernent chez *B. subtilis* font l'objet de recherches dans ce laboratoire [29-31]. L'analyse génétique est poursuivie par la transformation. Cette méthode est d'une efficacité et d'un pouvoir de résolution considérables. Elle est ainsi particulièrement indiquée pour l'analyse de la structure fine d'un locus. Cette analyse a été entreprise pour le locus de la thréonine désaminase [31]. Nous avons isolé de nombreux mutants dépourvus d'activité de thréonine désaminase et situé les marqueurs sur le locus. Parallèlement, nous avons étudié certaines propriétés de l'enzyme dans les extraits des cellules de la souche sauvage. Des mutants qui produisent une thréonine désaminase possédant des propriétés allostériques modifiées ont aussi été recherchés. Nous avons réussi à mettre en évidence l'existence de tels organismes au cours d'une étude de souches dont la croissance est inhibée par la L-valine et des clones reversés obtenus à partir de mutants exigeant l'isoleucine. Dans le présent mémoire nous exposons les résultats d'une étude comparative des propriétés de la thréonine désaminase de la souche sauvage et de celle d'un mutant sensible à la valine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Produits chimiques.

Les acides aminés et autres composés biochimiques utilisés dans ce travail sont des produits « A grade » de la firme Calbiochem. Les réactifs organiques et les sels minéraux sont des produits purs et de la qualité « pour analyses ». Pour certains autres composés la provenance est indiquée dans les sections correspondantes.

Souches bactériennes.

Les mutants étudiés sont issus de la souche transformable de *Bacillus subtilis* 168 Marburg. Nous avons utilisé la souche sauvage (WT) et deux mutants dont la croissance est inhibée par la L-valine : GSY505 et

GSY594. Le mutant GSY505 a été obtenu après action de la N-méthyl-N'-nitro'-N-nitrosoguanidine (Aldrich Chemical Co) sur WT. GSY594 est un clone reversé (réversion spontanée) d'un mutant exigeant l'isoleucine et la thymine GSY489 (*ilvA2⁻ thy⁻*). Le caractère de la sensibilité à la valine est apparu simultanément avec la perte de l'exigence en isoleucine. Le phénotype de la souche GSY594 est donc le suivant : sensibilité à la L-valine et exigence en thymine.

Préparation des extraits bactériens.

Les bactéries ont été cultivées dans le milieu synthétique de SPIZIZEN [32] contenant du glucose (0,50 p. 100 - Difco Bacto-Dextrose) comme source de carbone et additionné de thymine (20 µg/ml) pour la souche GSY594. Les cellules ont été recueillies par centrifugation à froid des cultures en phase exponentielle (densité optique : 0,70 - 0,80 à 525 mµ mesurée par un spectrophotomètre Beckman B), lavées avec le même milieu et resuspendues finalement dans un tampon tris (hydroxyméthyl) aminométhane-HCl (pH 8,0, 0,10 M) contenant du magnésium-titriplex (2×10^{-3} M) et du dithiothréitol (10^{-3} M). Le volume final de la suspension correspondait au cinquième (1/5) du volume initial de la culture dans le cas de la souche WT (sauvage) et au vingtième (1/20) de ce volume dans le cas des mutants sensibles à la valine. Les suspensions des cellules étaient ensuite traitées par le lysozyme (200 µg/ml) pendant 10 minutes à 37°. Les extraits bruts ainsi obtenus ont servi pour les dosages enzymatiques sans autre traitement. Leur concentration en protéines était de l'ordre de 1 mg/ml pour la souche WT et 3 mg/ml pour la souche GSY594. A cause de l'instabilité de la thréonine désaminase ces extraits ont été utilisés au plus tard deux heures après leur préparation. Avec de tels extraits, la relation de l'activité enzymatique en fonction du temps pendant la durée de la réaction (20 minutes) est linéaire. (Ce sont ces extraits qui ont servi pour les expériences présentées sur les figures).

Nous avons également effectué un certain nombre d'expériences avec des suspensions de cellules entières traitées par le toluène. Dans aucun cas, nous n'avons observé de différences en ce qui concerne les constantes cinétiques et les effets des inhibiteurs entre les extraits obtenus par la méthode standard décrite ci-dessus (culture en milieu minimal et traitement au lysozyme) et les cellules toluénisées.

Dosage de l'activité enzymatique.

La composition du mélange pour les mesures de l'activité était la suivante : L-thréonine 0,02 M ; pyridoxal phosphate 0,003 M ; tampon tris (hydroxyméthyl) aminométhane-HCl pH 8,0 0,1 M. L'extrait bactérien était ajouté à un volume de 0,10 ml pour un volume total de 1,0 ml par essai. Le mélange était incubé pendant 20 minutes à 37°. L'acide α-cétobutyrique formé était dosé par la méthode colorimétrique de FRIEDEMANN et HAUGEN [33], la coloration était mesurée à 440 mµ au spectrophotomètre Beckman, modèle B. Une solution d'acide α-cétobutyrique (Calbio-

chem) et une solution de pyruvate de sodium ont servi pour les gammes d'étalonnage. L'activité enzymatique est exprimée en millimicromoles d'acide cétonique formé par minute dans les conditions décrites ci-dessus. L'activité spécifique des extraits (évaluée en micromoles d'acide cétonique formé par milligramme de protéine par heure) était en général : 12 μ M pour la souche sauvage et 2,5 μ M pour le mutant GSY594. Pour les cas où certaines de ces conditions étaient modifiées, les nouvelles conditions adoptées sont précisées sur les légendes des figures.

Dosage des protéines.

La concentration en protéines des extraits bactériens a été déterminée par la technique de LOWRY, ROSEBROUGH, FARR et RANDALL [34]. La sérumalbumine bovine cristallisée (Armour Pharmaceutical Co) a été utilisée comme étalon.

RÉSULTATS.

Propriétés des mutants sensibles à la valine.

Dans le but d'obtenir des mutants de régulation des voies de biosynthèse de l'isoleucine et de la valine, nous avons recherché des organismes dont la croissance était inhibée par la L-valine. Nous avons sélectionné une telle souche (GSY505) après action de la N-méthyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine sur la souche WT. Ce mutant pousse bien sur le milieu minimal, mais sa croissance est arrêtée en présence de faibles concentrations de valine. Une concentration de $3,4 \times 10^{-5}$ M est suffisante pour provoquer une inhibition de la croissance de 50 p. 100. Sur le Tableau I sont présentés quelques résultats sur cet effet de la valine.

TABLEAU I.

Effet de la L-valine sur la croissance du mutant GSY505.

Concentration en valine (μ g/ml)	Croissance (*) (E_{525})
0	0,930
2	0,740
5	0,270
10	0,180
20	0,160

Des flacons contenant du milieu minimal additionné de glucose (0,50 p. 100) et de quantités variables de L-valine ont étéensemencés avec une culture de la souche GSY505 en phase exponentielle. Les cultures ont été incubées à 37° avec agitation pendant 16 heures. La croissance a été suivie par des mesures de la densité optique à 525 m μ avec un spectrophotomètre Beckman, modèle B. Leur densité optique initiale était de 0,050.

(*) Les chiffres correspondent au plateau de densité optique atteint par chaque culture à la phase stationnaire.

Nous avons ensuite observé que la L-isoleucine, la L-thréonine et la L-homosérine étaient capables de lever l'inhibition exercée par la L-valine (Tableau II). Deux intermédiaires de la synthèse de l'isoleucine que nous avons testés (acide α -cétobutyrique et acide α -acéto- α -hydroxybutyrique) ont aussi empêché l'inhibition. Les intermédiaires de la synthèse de la valine, par contre, n'ont eu aucun effet, ni sur la croissance de la souche, ni sur son inhibition par la valine. Ces faits suggèrent que la L-valine pourrait agir sur les voies de synthèse de la thréonine et de l'isoleucine.

TABLEAU II.

*Effet des acides aminés
sur l'inhibition de la croissance du mutant GSY505 par la L-valine.*

Acide aminé ajouté	Croissance (*)
Aucun	100
L-valine.....	28
L-valine + L-isoleucine.....	130
L-valine + L-leucine.....	62
L-valine + L-thréonine.....	129
L-valine + L-méthionine	25
L-valine + acide L-aspartique.....	25
L-valine + acide L-glutamique.....	21
L-valine + L-arginine.....	34
L-valine + L-lysine.....	28
L-valine + L-cystéine.....	28
L-valine + L-phénylalanine	24
L-valine + L-tyrosine.....	28
L-valine + L-tryptophane.....	34
L-valine + L-glycine.....	26
L-valine + L-alanine	28
L-valine + L-proline.....	27
L-valine + L-histidine	32
L-valine + L-homosérine.....	128

Les expériences ont été effectuées dans les mêmes conditions que pour le Tableau I. La concentration de chaque acide aminé était de 20 μ g/ml.

(*) La croissance des cultures a été comparée à celle de la culture ne contenant pas d'acides aminés arbitrairement fixée à 100. La L-sérine qui inhibe la croissance de la souche 168 Marburg de *B. subtilis* n'a pas été incluse dans les essais. Certains acides aminés augmentent la vitesse de croissance en absence de L-valine.

Les études génétiques (poursuivies par la transformation) ont révélé que le marqueur de la sensibilité à la valine (*val^{sens}*) de ce mutant était situé à l'intérieur du locus de la thréonine désaminase. Ces résultats génétiques font l'objet d'un mémoire séparé [31]. L'activité de la thréonine désaminase dans les extraits du mutant GSY505 est très faible et difficilement mesurable. Elle correspond à environ 1-2 p. 100 de celle des extraits de la souche WT. Malgré ce fait, le mutant ne nécessite pas d'isoleucine pour sa croissance.

Nous avons par la suite observé que les clones reversés prototrophes de certains mutants exigeant l'isoleucine possèdent eux aussi la propriété d'être inhibés par la valine. Une de ces reversées, GSY594, a été plus particulièrement étudiée. L'inhibition de sa croissance nécessite des concentrations en valine plus élevées que pour la souche GSY505 (Tableau III). La présence d'activité de thréonine désaminase chez cette

TABLEAU III.

Effet de la L-valine sur la croissance du mutant GSY594.

Concentration en valine ($\mu\text{g/ml}$)	Croissance (*) (E_{525})
0	1,680
2	1,635
5	1,040
10	1,030
20	0,230
50	0,108
100	0,075
200	0,080

Expériences effectuées comme pour le tableau I.

(*) Le milieu de culture contenait en outre de la thymine (20 $\mu\text{g/ml}$).

souche n'est pas due à une mutation du type supprimeur extragénique. Il s'agit soit d'une « réversion partielle », au site même de la mutation initiale (*ilvA2⁻*), soit d'un supprimeur intragénique très fortement lié à ce site. Il n'a pas été possible de récupérer par recombinaison la mutation initiale à partir de la souche reversée [31]. L'activité spécifique de la thréonine désaminase dans les extraits de cette souche est d'environ 5 fois plus faible que celle de la souche sauvage. Du fait que cette activité est notamment plus élevée que celle du premier mutant isolé (GSY505) nous avons utilisé de préférence la souche GSY594 dans l'étude comparative des propriétés de la thréonine désaminase du type sauvage et d'une souche sensible à la valine.

Cinétique de l'activité de l'enzyme en fonction de la concentration en substrat.

Les figures 1 et 2 mettent en évidence les différences importantes qui existent entre l'enzyme de la souche sauvage (WT) et celui du mutant sensible à la valine, GSY594, en ce qui concerne leur cinétique d'action vis-à-vis du substrat. Tout d'abord les K_m apparents sont différents. (Nous avons considéré comme K_m apparent la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale est la moitié de la vitesse initiale maximale observée). Ces valeurs sont 4×10^{-3} M pour WT et $2,6 \times 10^{-2}$ M pour GSY594. L'affinité de la thréonine désaminase du mutant pour son substrat est donc 6,5 fois plus faible que celle de l'enzyme de la souche

sauvage (Les valeurs de K_m apparent obtenues avec différents extraits de la même souche varient légèrement ; les différences entre les constantes des enzymes des deux souches sont néanmoins toujours très signi-

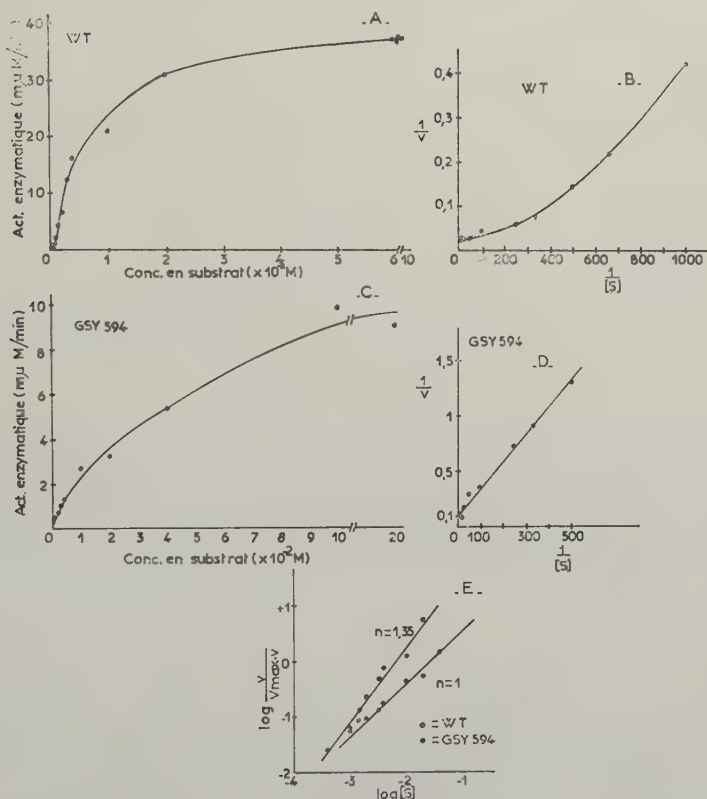


FIG. 1. — *Activité de la thréonine désaminase de la souche sauvage (WT) et de la souche GSY594 en fonction de la concentration en substrat.*

A et B : souche WT.

C et D : souche GSY594.

A et C, en abscisses : la concentration molaire en L-thréonine, en ordonnées : la vitesse initiale de la réaction.

B et D, présentation graphique selon LINEWEAVER et BURK. en abscisses : l'inverse de la concentration en substrat, en ordonnées : l'inverse de la vitesse initiale.

Les autres conditions sont celles décrites dans la partie « Matériel et Méthodes ».

K_m apparents : WT = 4×10^{-3} M, GSY594 = $2,6 \times 10^{-2}$ M.

E : les données sont portées dans le système de coordonnées de HILL.

en abscisses : logarithme de la concentration en substrat,

en ordonnées : logarithme du rapport $\frac{v}{V_{max}-v}$.

Seule, la portion linéaire du graphique tracé suivant l'équation de HILL est représentée.

ficatives). D'autre part, tandis que la courbe obtenue avec l'enzyme du type sauvage a une forme sigmoïde, celle de l'enzyme du mutant suggère une cinétique typique d'HENRI-MICHAELIS. Cette dernière différence se rend plus manifeste si l'on adopte la présentation des résultats selon LINEWEAVER et BURK [35] (Figure I B et D). Un effet coopératif du substrat est donc mis en évidence pour l'enzyme de la souche sauvage, mais ne s'observe pas chez l'enzyme du mutant. On aboutit également à la même conclusion si l'on traite les données suivant l'équation de HILL (Fig. I E). Les valeurs du coefficient d'interaction (n) sont les suivantes : 1,35 pour la thréonine désaminase du WT et 1,0 pour celle du GSY594.

Cinétique de l'inhibition de la thréonine désaminase par l'isoleucine et la valine.

L'enzyme de la souche sauvage est inhibé par l'isoleucine à des faibles concentrations comme c'est le cas pour la thréonine désaminase de biosynthèse de tous les microorganismes étudiés jusqu'à présent (Fig. 2). On

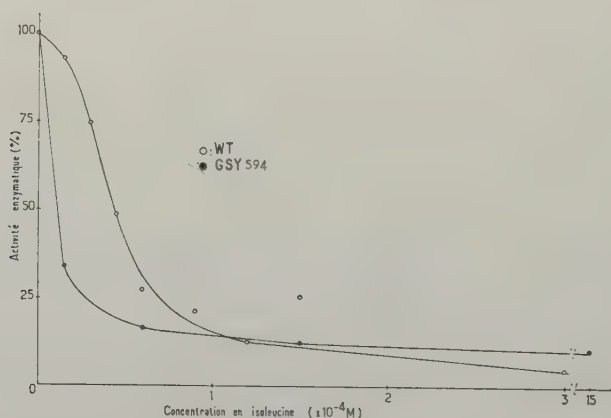


Fig. 2. — Inhibition de la thréonine désaminase des souches WT et GSY594 en fonction de la concentration en L-isoleucine.

En abscisses : la concentration moléculaire en inhibiteur.

En ordonnées : l'activité enzymatique résiduelle, en pourcentage de celle de l'essai témoin ne contenant pas l'inhibiteur.

Les conditions de la mesure de l'activité sont celles décrites dans la partie « Matériel et Méthodes ». Concentration en substrat : 2×10^{-2} M.

observe également un effet coopératif de cet inhibiteur. Le K_i apparent (calculé comme la concentration en isoleucine qui provoque une inhibition de 50 p. 100 dans les conditions de ces expériences) est de 7×10^{-5} M. L'enzyme de la souche GSY594 est encore plus sensible à cette action inhibitrice. Son affinité pour l'isoleucine est d'environ 5 fois plus élevée que celle de l'enzyme du type sauvage, dans les mêmes conditions (K_i apparent : 10^{-5} M). Toutefois on n'observe pas d'effet coopératif de l'iso-

leucine avec l'enzyme du mutant. Le coefficient n' calculé suivant l'équation de HILL est de 1,57 pour la thréonine désaminase du WT et de 1,0 pour celle du GSY594 (Tableau IV).

TABLEAU IV.

Effets coopératifs homotropes de l'isoleucine et de la valine sur l'activité de la thréonine désaminase des souches WT et GSY594.

Souche	Inhibiteur	n'
WT	L-isoleucine	1,57
»	L-valine	1,12
GSY594	L-isoleucine	0,83
»	L-valine	1,00

n' : coefficient d'interaction calculé par l'équation de HILL d'après les données des figures 4 et 5.

La figure 3 présente l'inhibition de la thréonine désaminase des deux souches par la L-valine. L'enzyme de la souche sauvage est aussi inhibé par cet acide aminé, mais l'inhibition a lieu à des concentrations relativement élevées en effecteur (K_I apparent = 10^{-2} M). L'enzyme du mutant est d'environ 33 fois plus sensible, si l'on compare les concentrations en valine qui causent 50 p. 100 d'inhibition (K_I apparent = 3×10^{-4} M). Il n'y a pas d'effet coopératif de la valine ni pour l'enzyme du WT, ni pour celui du mutant (Tableau IV).

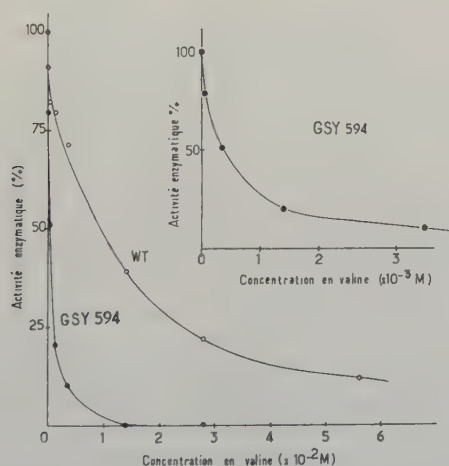


FIG. 3. — Inhibition de l'activité de la thréonine désaminase des souches WT et GSY594 en fonction de la concentration en L-valine.

Les autres conditions adoptées pour ces expériences et la présentation des résultats sont les mêmes que pour la figure 4.

La valine constitue un activateur de la plupart des thréonines désaminases étudiées [4, 9, 16, 19, 22, 24]. Nous n'avons pas observé un tel effet de la valine sur l'enzyme de *B. subtilis* (souche WT ou GSY594). Il est cependant vraisemblable, que dans nos conditions, cet effet soit masqué par l'action inhibitrice de l'effecteur. Une très faible inhibition par des concentrations élevées de valine a été signalée chez l'enzyme de *E. coli* K 12 [9]. Cette inhibition est d'environ dix fois inférieure à celle que nous avons observée chez l'enzyme de la souche sauvage de *B. subtilis* avec les mêmes concentrations de valine.

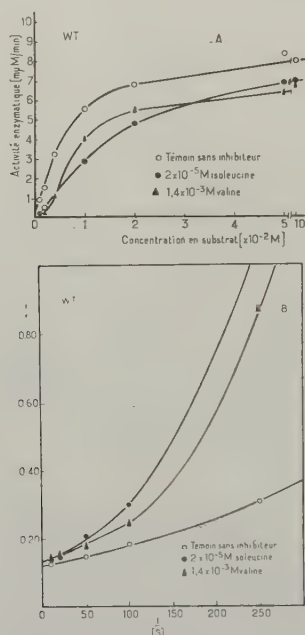


FIG. 4. — Action de la *L*-isoleucine et de la *L*-valine sur la thréonine désaminase de la souche sauvage (WT) en fonction de la concentration en substrat.

A, B : présentation des résultats et conditions des expériences comme pour la figure 1. K_m apparents : $\circ$ 5×10^{-3} M ; $\bullet$ $1,5 \times 10^{-2}$ M ; $\blacktriangle$ $1,0 \times 10^{-2}$ M.

CHANGEUX [10] a également isolé un mutant de *E. coli* K 12 dont la thréonine désaminase est un peu plus sensible à l'inhibition par la valine. Cet organisme est un clone reversé d'un mutant exigeant l'isoleucine, comme c'est le cas de notre souche GSY594. L'inhibition par la valine est néanmoins, dans ce cas, très faible, comparée à celle de l'enzyme de la souche GSY594 de *B. subtilis*. En outre, l'enzyme de ce mutant d'*E. coli* est activé, et non pas inhibé, par l'isoleucine. Une inhibition relativement importante par la valine a été trouvée par DATTA, sur l'enzyme de *R. spheroides* [24] et a fait l'objet d'études cinétiques. Les résultats de cet auteur sont assez analogues à ceux que nous avons obtenus

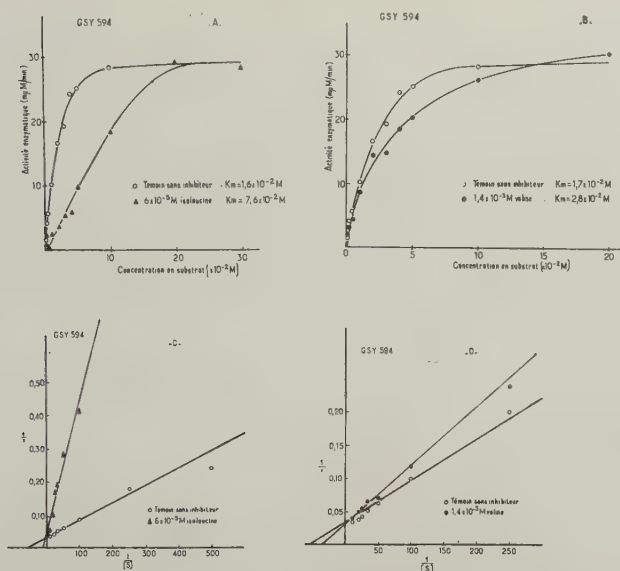


FIG. 5. — Action de la L-isoleucine et de la L-valine sur la thréonine désaminase de la souche GSY594 en fonction de la concentration du substrat.

A, C : action de la L-isoleucine.

B, D : action de la L-valine.

Conditions des expériences et présentation des résultats comme pour la figure 1.

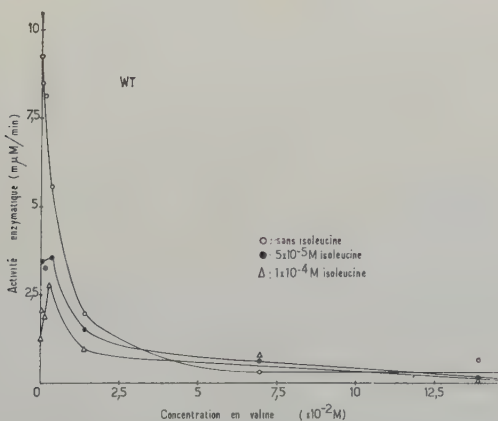


FIG. 6. — Effet de la L-valine sur l'inhibition de la thréonine désaminase de la souche sauvage (WT) par la L-isoleucine.

La concentration en substrat et les autres conditions de ces expériences sont celles décrites dans la partie « Matériel et Méthodes ».

avec l'enzyme de la souche sauvage de *B. subtilis*. Toutefois, l'enzyme de *R. spheroides* est moins sensible que celui de *B. subtilis* à cette inhibition et il est, en outre, activé par de faibles concentrations de valine.

Nous avons étudié l'action des deux inhibiteurs sur les enzymes des deux souches en fonction de la concentration en substrat (Fig. 4 et 5). Aussi bien l'isoleucine que la valine semblent provoquer une diminution de la vitesse maximale initiale ($V_{\max}$) chez l'enzyme de la souche sauvage, cet effet est toutefois relativement faible. Ces inhibiteurs augmentent d'autre part d'une façon bien évidente les valeurs du K_m apparent. Ceci est vrai pour les deux enzymes. En ce qui concerne l'enzyme de la souche sauvage (Fig. 4 B) l'effet coopératif du substrat est manifeste également en présence des inhibiteurs.

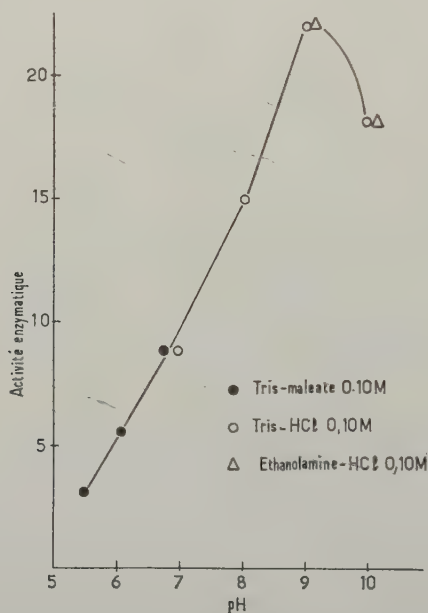


FIG. 7. — Activité de la thréonine désaminase de la souche sauvage (WT) en fonction du pH.

En abscisses : la vitesse initiale de la réaction (en μM d'acide cétonique formé par minute).

Les différents systèmes tampons employés sont indiqués sur la figure. La concentration en substrat et les autres conditions sont celles précisées dans la partie « Matériel et Méthodes ».

Nous avons recherché si la L-valine exerce une influence sur l'inhibition par l'isoleucine. La figure 6 montre qu'à des concentrations de valine inférieures à $1,5 \times 10^{-2}$ M, l'inhibition par l'isoleucine est plus faible. A de plus fortes concentrations, l'action inhibitrice de la valine semble masquer cet effet. Cette levée partielle de l'effet inhibiteur de l'isoleucine pourrait être la conséquence de l'attachement de la valine sur un deuxième site distinct de celui de l'inhibition.

Effet du pH sur l'activité enzymatique et sur son inhibition par l'isoleucine et la valine.

Le pH optimum d'action de la thréonine désaminase de *B. subtilis* (souche sauvage) se situe aux environs de pH 9,0 (Fig. 7). Sur ce point cet enzyme se rapproche des thréonine désaminases d'autres bactéries : *E. coli* K 12 [9], *B. licheniformis* [26], *S. typhimurium* [19].

L'inhibition par l'isoleucine et la valine est, par contre, plus importante à pH 8,0 (Fig. 8). Aux valeurs de pH les plus éloignées des deux côtés de cet optimum pour l'inhibition (pH 5,0 et 10,0) on observe une légère activation.

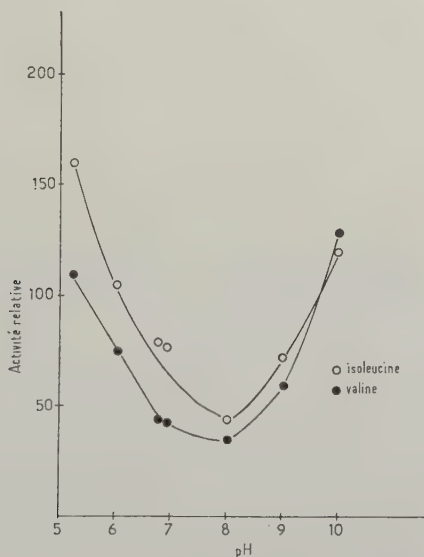


FIG. 8. — Action de la *L*-isoleucine et de la *L*-valine sur l'activité de la thréonine désaminase de la souche sauvage (WT) en fonction du pH.

Activité relative : activité (en pourcentage) d'un essai par rapport à celle de l'essai témoin ne contenant pas d'effecteur.

Nous avons utilisé les mêmes systèmes tampons précisés sur la fig. 9. Les autres conditions sont celles décrites dans la partie « Matériel et Méthodes ».

Le fait que le pH optimum de l'action des inhibiteurs est différent de celui de l'activité enzymatique, suggère que l'isoleucine et la valine ne se combinent pas au site de fixation du substrat. Les résultats de la figure 8 suggèrent également que le site d'attachement pourrait être le même pour l'isoleucine et la valine.

DISCUSSION.

Notre étude permet de conclure que la thréonine désaminase de *B. subtilis* est bien un enzyme allostérique comme c'est le cas chez tous les microorganismes étudiés jusqu'à présent. L'inhibiteur le plus spécifique

est la L-isoleucine. Sur ce point nos résultats sont en accord avec les observations de HAYASHIBE et UEMURA [27] et de HATFIELD et UMBARGER [28] et corroborent les conclusions de ces auteurs.

Le modèle de MONOD, WYMAN et CHANGEUX [15] peut rendre compte de tous les faits observés. L'isoleucine et la valine modifient l'affinité (*) de l'enzyme pour le substrat. On observe également des effets coopératifs homotropes aussi bien pour le substrat que pour l'isoleucine chez l'enzyme de la souche sauvage. Ces faits sont caractéristiques d'un système K. Toutefois cet enzyme ne semble pas appartenir aux systèmes K purs. Dans les conditions de nos expériences, les inhibiteurs semblent avoir aussi un effet sur la vitesse initiale maximale. L'état de l'enzyme pour lequel les effecteurs ont une grande affinité doit donc posséder une activité catalytique moindre. L'enzyme de *B. subtilis* diffère ainsi de ceux de *E. coli* K 12 [15], de *B. licheniformis* [26] ou de levure [22] qui sont des systèmes K purs. Il ressemble par contre, de ce point de vue à l'enzyme de *Rhodopseudomonas spheroides* [24].

D'après nos résultats la L-valine semble être un véritable inhibiteur allostérique de la thréonine désaminase de *B. subtilis*. Le fait qu'une mutation sur le gène de structure entraîne la formation d'un enzyme dont la sensibilité à la valine est très augmentée, renforce cette hypothèse. Nous ne pouvons pas cependant savoir actuellement si cette action inhibitrice de la L-valine joue vraiment un rôle régulateur sur la voie de biosynthèse de l'isoleucine chez la souche sauvage.

Nos résultats sur l'action de la valine peuvent être interprétés en admettant que la valine se fixe, soit sur le site de l'isoleucine, soit sur un site voisin qui chevauche celui-ci. Trois observations, en particulier, plaident en faveur de cette hypothèse : a) l'enzyme du mutant sensible à la valine présente également une affinité accrue pour l'isoleucine ; b) le pH optimum de l'inhibition est le même pour les deux composés et c) les effets inhibiteurs de l'isoleucine et de la valine ne sont pas additifs. DATTA [24] a envisagé la même hypothèse pour l'inhibition de la thréonine désaminase de *R. spheroides* par la valine.

Il ne semble pas que le site des inhibiteurs soit identique au site catalytique (= site de fixation du substrat), tout au moins pour l'enzyme de la souche sauvage. En dehors des données cinétiques, les considérations suivantes rendent peu plausible une telle situation : a) les inhibiteurs ne sont pas des analogues structuraux du substrat, b) le pH optimum de l'inhibition est différent du pH optimum de l'activité enzymatique et c) les inhibiteurs exercent aussi un effet sur la valeur de la V_{max} .

Les différences dans les propriétés enzymatiques entre la thréonine désaminase du mutant GSY594 et celle de la souche sauvage, traduisent le plus vraisemblablement une différence dans la conformation des molécules de l'enzyme produit par les deux souches. Nous avons déjà remarqué que l'enzyme du mutant GSY594 a une affinité plus faible pour le substrat et une affinité plus forte pour les inhibiteurs que celui de la sou-

(*) Le terme « affinité » est employé dans ce mémoire dans son sens le plus large et non dans le sens strict de l'inverse du K_m (ou K_d).

che sauvage. On a constaté d'autre part, chez cet enzyme l'absence des effets coopératifs homotropes. La cinétique est typiquement michaélienne et les inhibiteurs semblent se comporter comme de véritables inhibiteurs compétitifs. On pourrait envisager que l'équilibre entre les deux états R_0 et T_0 , comme définis par MONOD, WYMAN et CHANGEUX [15], soit dans ce cas très en faveur de l'état R_0 . (La forme R_0 de l'enzyme du mutant devrait être évidemment différente de la forme R_0 de l'enzyme du type sauvage). L'addition d'isoleucine déplace cet équilibre vers l'état T_0 qui a une affinité encore plus faible pour le substrat. Une hypothèse alternative semble toutefois permettre également l'interprétation des faits observés : la conformation particulière de l'enzyme du mutant a pour conséquence la stabilisation d'un état de la molécule et une modification de la structure du site catalytique qui devient ainsi capable de fixer l'isoleucine et la valine. Des études cinétiques plus détaillées et des essais de désensibilisation de l'enzyme que nous nous proposons d'entreprendre devraient nous permettre de choisir entre ces deux hypothèses.

Nous avons déjà signalé que nous avons obtenu de nombreuses souches avec des degrés différents de sensibilité à la valine. Leurs thréonine désaminases possèdent des propriétés assez proches de celle de l'enzyme de la souche GSY594. Pour certaines souches nouvellement isolées, ces propriétés ne se manifestent qu'à des températures élevées (42°). Leur étude détaillée est actuellement en cours. Les organismes sensibles à la valine constituent la seule classe de mutants de *B. subtilis* actuellement connue qui forme un enzyme modifié dans ses propriétés régulatrices. L'affinité élevée de cet enzyme pour la valine suffit pour expliquer l'inhibition de la croissance des mutants par cet acide aminé et sa levée par l'isoleucine. D'autre part, la faible affinité pour le substrat rend bien compte du fait que cette inhibition de la croissance est aussi levée par la thréonine et l'homosérine. L'analyse génétique que nous poursuivons permettra de conclure si ces sites de sensibilité à la valine sont groupés à certaines régions du gène de structure de l'enzyme ou, au contraire, dispersés sur toute la longueur du locus.

Ce travail a bénéficié d'une aide de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (contrat N° 66 00 430).

SUMMARY.

The properties of the biosynthetic threonine deaminase (TDase) of *Bacillus subtilis* have been studied with fresh cell-free extracts from wild type and from a mutant the growth of which is inhibited by L-valine. This valine sensitive strain bears a mutation on the structural gene for TDase and its extracts show low specific activity for this enzyme.

TDase from wild type has an apparent K_m of 5×10^{-3} M at pH 8.0. The enzyme is inhibited by L-isoleucine (apparent K_i : 7×10^{-5} M in the conditions chosen) and by L-valine. However valine inhibits only at high concentrations (apparent K_i : 10^{-2} M). Cooperative effects for substrate and isoleucine have been found with this enzyme. Valine does not activate this TDase, but at low concentrations diminishes the inhibitory action of isoleucine. Both inhibitors

lower the affinity of the enzyme for the substrate and also seem to have some effect on the V_{max} values observed. The pH optimum of the enzyme is about 9,0. The inhibition by isoleucine and valine shows however an optimum at pH 8,0.

The TDase of the valine sensitive mutant shows some different properties from that of the wild type strain. Its K_m is higher (2×10^{-3} M at pH 8,0) and there is no indication for a cooperative effect of the substrate. Affinity of the enzyme for the inhibitors (especially valine) is higher (apparent K_i 's : isoleucine, 10^{-5} M ; valine, 3×10^{-4} M). No cooperative effect of isoleucine could be shown. As in the case of the wild type enzyme, the inhibitors lower the affinity of this enzyme for the substrate.

These results corroborate previous observations suggesting that *B. subtilis* TDase is an allosteric enzyme subject to feedback inhibition by isoleucine. It seems to be a K system according to the model of MONOD, WYMAN and CHANGEUX. L-valine also seems to be an allosteric inhibitor of this enzyme. The differences in the properties of the wild type and mutant strain enzymes could be ascribed to differences in the conformation of the two molecules. The following hypotheses were considered as regards the TDase of the valine sensitive mutant : (a) the native enzyme may be stabilized in a particular form or (b) there is a modification in the structure of the catalytic site.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die Eigenschaften der Biosynthese-Threonin-Desaminase (TD-ase) von *Bacillus subtilis* sind mit frischen zelllosen Extrakten des wilden Stamms und einer Mutante, deren Wachstum durch das L-Valin inhibiert wird, untersucht worden. Der Valin-empfindliche Stamm trägt eine Mutation auf dem Strukturgen der TD-ase und seine Extrakte besitzen eine verminderte spezifische Aktivität für dieses Enzym.

Die TD-ase des wilden Stamms hat ein Schein- K_m von 5×10^{-3} M bei pH 8,9. Sie wird durch das L-Isoleucin (Schein- K_i von 7×10^{-5} M unter den gewählten Versuchsbedingungen) und durch das L-Valin inhibiert. Das Valin übt jedoch seine inhibierende Wirkung nur bei hohen Konzentrationen aus (Schein- $K_i = 10^{-2}$ M). Kooperative Wirkungen des Substrats und des Isoleucins sind bei diesem Enzym nachgewiesen worden. Das Valin aktiviert nicht diese TD-ase, aber bei schwachen Konzentrationen vermindert es die inhibierende Wirkung des Isoleucins. Die beiden Inhibitoren setzen die Affinität des Enzyms für das Substrat herab und haben anscheinend auch eine gewisse Wirkung auf die beobachteten Werte des V_{max} . Das Optimum-pH des Enzyms ist ungefähr 9,0. Die inhibierende Wirkung des Isoleucins und des Valins weist dagegen ein Optimum-pH bei 8,0 auf.

Die TD-ase der Valin-empfindlichen Mutante weist einige Eigenschaften auf, die sich von denjenigen des wilden Stamms unterscheiden. Ihr K_m liegt höher (2×10^{-3} M bei pH 8,0) und man beobachtet keine kooperative Wirkung des Substrats. Die Affinität des Enzyms für die Inhibitoren (und besonders für das L-Valin) ist andererseits höher (Schein- K_i : Isoleucin 10^{-5} M ; Valin 3×10^{-4} M). Es gibt keine kooperative Wirkung des Isoleucins. Wie im Falle des Wildtypen-enzym, verringern die Inhibitoren die Affinität des Mutantenenzym für das Substrat.

Die beobachteten Tatsachen bestätigen die früheren Beobachtungen, welche vermuten lassen, dass die TD-ase von *B. subtilis* wohl ein durch das Isoleucin rückinhibitiertes allosterisches Enzym ist. Es ist mit den K-Systemen des Modells von MONOD, WYMAN und CHANGEUX verwandt. Das L-Valin scheint auch ein allosterischer Inhibitor des Enzyms zu sein. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die TD-ase der Valin-empfindlichen Mutante sich von derjenigen des Wildtypus in ihrer Konfiguration unterscheiden könnte. Man könnte bei dem Enzym der Mutante entweder eine Stabilisation eines besonderen Zustands des Moleküls oder eine Modifikation der Struktur des katalytischen Zentrums in Betracht ziehen.

BIBLIOGRAPHIE.

1. UMBARGER, H. E. — *Science*, 1956, **123**, 848.
2. UMBARGER, H. E. et BROWN, B. — *J. Bacteriol.*, 1957, **73**, 105.
3. UMBARGER, H. E. et BROWN, B. — *J. Biol. Chem.*, 1958, **233**, 415.
4. CHANGEUX, J.-P. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1961, **26**, 313.
5. CHANGEUX, J.-P. — *J. Mol. Biol.*, 1962, **4**, 220.
6. CHANGEUX, J.-P. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1963, **28**, 497.
7. CHANGEUX, J.-P. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, **46**, 927.
8. CHANGEUX, J.-P. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, **46**, 947.
9. CHANGEUX, J.-P. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, **46**, 1151.
10. CHANGEUX, J.-P. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, **47**, 115.
11. CHANGEUX, J.-P. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, **47**, 267.
12. CHANGEUX, J.-P. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, **47**, 281.
13. SANCHEZ, C. et CHANGEUX, J.-P. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1966, **48**, 705.
14. MONOD, J., CHANGEUX, J.-P. et JACOB, F. — *J. Mol. Biol.*, 1963, **6**, 306.
15. MONOD, J., WYMAN, J. et CHANGEUX, J.-P. — *J. Mol. Biol.*, 1965, **12**, 88.
16. FREUNDLICH, M. et UMBARGER, H. E. — *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1963, **28**, 505.
17. CENNAMO, C. et CARRETTI, D. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, **122**, 371.
18. MAEBA, P. et SANWAL, B. D. — *Biochemistry*, 1966, **5**, 525.
19. BURNS, R. O. et ZARLENGO, M. H. — *J. Biol. Chem.*, 1968, **243**, 178.
20. HOLZER, H., BOLL, M. et CENNAMO, C. — *Angew. Chem.*, 1963, **75**, 894.
21. CENNAMO, C., BOLL, M. et HOLZER, H. — *Biochem. Z.*, 1964, **340**, 125.
22. DE ROBICHON-SZULMAJSTER, H. et MAGEE, P. T. — *Europ. J. Biochem.*, 1968, **3**, 492.
23. HUGHES, M., BRENNEMAN, C. et GEST, H. — *J. Bacteriol.*, 1964, **88**, 1201.
24. DATTA, P. — *J. Biol. Chem.*, 1966, **241**, 5836.
25. NING, C. et GEST, H. — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1966, **56**, 1823.
26. LEITZMANN, C. et BERNLOHR, R. W. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, **151**, 449.
27. HAYASHIBE, M. et UEMURA, T. — *Nature*, 1961, **191**, 1417.
28. HATFIELD, G. W. et UMBARGER, H. E. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1968, **33**, 397.
29. ANAGNOSTOPOULOS, C. et BARAT, M. — *C. R. Acad. Sci.*, 1964, **258**, 749.
30. BARAT, M., ANAGNOSTOPOULOS, C. et SCHNEIDER, A.-M. — *J. Bacteriol.*, 1965, **90**, 357.
31. LEIBOVICI, J., JAMET, C. et ANAGNOSTOPOULOS, C. — Manuscrit en préparation.
32. SPIZIZEN, J. — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1958, **44**, 1072.
33. FRIEDEMANN, T. E. et HAUGEN, G. E. — *J. Biol. Chem.*, 1943, **147**, 415.
34. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. et RANDALL, R. J. — *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265.
35. LINEWEAVER, H. et BURK, D. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1934, **56**, 658.



IMPRIMERIE M. DECLUME, LONS-LE-SAUNIER.

